

## **Prevalência de Espécies de *Fusarium* Produtoras de Fumonisinhas Associadas a Grãos de Milho no Brasil**



# ***Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 112***

## **Prevalência de Espécies de *Fusarium* Produtoras de Fumonisinhas Associadas a Grãos de Milho no Brasil**

Rodrigo Veras da Costa  
Valéria Aparecida Vieira Queiroz  
Luciano Viana Cota  
Dagma Dionísia da Silva  
Fabrício Eustáquio Lanza  
Laércio Zambolim  
José Edson Fontes Figueiredo

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Milho e Sorgo**

Rod. MG 424 Km 45

Caixa Postal 151

CEP 35701-970 Sete Lagoas, MG

Fone: (31) 3027-1100

Fax: (31) 3027-1188

Home page: [www.cnpms.embrapa.br](http://www.cnpms.embrapa.br)

E-mail: [cnpms.sac@embrapa.br](mailto:cnpms.sac@embrapa.br)

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente: Sidney Netto Parentoni

Secretário-Executivo: Elena Charlotte Landau

Membros: Antonio Claudio da Silva Barros, Dagma Dionísia da Silva, Maria Marta Pastina, Monica Matoso Campanha, Paulo Eduardo de Aquino Ribeiro e Rosângela Lacerda de Castro

Revisão de texto: Antonio Claudio da Silva Barros

Normalização bibliográfica: Rosângela Lacerda de Castro

Tratamento de ilustrações: Tânia Mara Assunção Barbosa

Editoração eletrônica: Tânia Mara Assunção Barbosa

Foto(s) da capa: Rodrigo Veras da Costa

**1ª edição**

1ª impressão (2014): on line

**Todos os direitos reservados**

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

**Embrapa Milho e Sorgo**

---

Prevalência de espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisinas associadas a grãos de milho no Brasil / Rodrigo Veras da Costa ... [et al.]. – Sete Lagoas : Embrapa Milho e Sorgo, 2014.

27 p. : il. -- (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento / Embrapa Milho e Sorgo, ISSN 1679-0154; 112).

1. Fungo. 2. Micotoxina. 3. *Zea mays*. I. Costa, Rodrigo Veras da. II. Série.

---

CDD 579.5 (21. ed.)

© Embrapa 2014

# Sumário

<b>Resumo</b>	4
<b>Abstract</b>	6
<b>Introdução</b>	7
<b>Material e Métodos</b>	9
<b>Resultados</b>	14
<b>Discussão</b>	18
<b>Conclusões</b>	21
<b>Referências</b>	21

# **Produtividade da Rebrota de Cultivares de Sorgo Sacarino em Diferentes Épocas de Semeio**

***Rodrigo Veras da Costa<sup>1</sup>***

***Valéria Aparecida Vieira Queiroz<sup>2</sup>***

***Luciano Viana Cota<sup>3</sup>***

***Dagma Dionísia da Silva<sup>4</sup>***

***Fabício Eustáquio Lanza<sup>5</sup>***

***Laércio Zambolim<sup>6</sup>***

***José Edson Fontes Figueiredo<sup>7</sup>***

## **Resumo**

Nos últimos anos, grande ênfase tem sido dada aos fitopatógenos que atacam os grãos de milho, principalmente pela sua capacidade de produção de micotoxinas. Fumonisinás são consideradas as micotoxinas mais importantes para a cultura, sendo produzidas em maior quantidade por fungos do gênero *Fusarium*, que contem espécies altamente complexas quanto a sua identificação. O estudo da distribuição geográfica de espécies de *Fusarium* produtoras de fumonisinás e seu potencial de produção dessa micotoxina é fundamental

---

<sup>1</sup>Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, rodrigo.veras@embrapa.br

<sup>2</sup>Nutricionista, D.Sc. em Produção Vegetal, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, valeria.vieira@embrapa.br

<sup>3</sup>Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, luciano.cota@embrapa.br

<sup>4</sup>Engenheira Agrônoma, D.Sc. em Fitopatologia, Pesquisadora da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, dagma.silva@embrapa.br

<sup>5</sup>Engenheiro Agrônomo, Doutorando em Fitopatologia na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, falanza@bol.com.br

<sup>6</sup>Engenheiro Agrônomo, D.Sc. em Fitopatologia, Professor Titular na Universidade Federal de Viçosa - UFV, Viçosa, MG, zambolim@ufv.br

<sup>7</sup>Biólogo, D.Sc. em Genética Molecular, Pesquisador da Embrapa Milho e Sorgo, Sete Lagoas, MG, jose.edson@embrapa.br

para o estabelecimento de estratégias de manejo visando a redução dos níveis de contaminação dos alimentos. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivos: Identificar as espécies de *Fusarium* da seção *Liseola* associadas a grãos de milho no Brasil por métodos morfológicos e moleculares; Determinar as espécies predominantes em grãos de milho nas diferentes regiões geográficas do Brasil; Caracterizar o potencial de produção de fumonisinas de isolados de *Fusarium* spp. coletados em diferentes regiões brasileiras. Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir: *F. verticillioides* é a espécie do gênero *Fusarium* predominantemente associada a grãos de milho no Brasil (99%); todos os 50 isolados selecionados foram capazes de produzir fumonisinas; elevada variabilidade na produção de fumonisinas, com isolados produzindo desde 0,01 a 2,39  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , não sendo detectada correlação com a região geográfica de origem; *F. proliferatum* e *F. subglutinans* são patógenos pouco frequentes em milho no Brasil.

**Palavras-chave:** *Fusarium* spp., fumonisinas, micotoxinas, milho

# Prevalence of *Fusarium* Species Producing Fumonisin Associated With Maize Grains in Brazil

*Rodrigo Veras da Costa*<sup>1</sup>

*Valéria Aparecida Vieira Queiroz*<sup>2</sup>

*Luciano Viana Cota*<sup>3</sup>

*Dagma Dionísia da Silva*<sup>4</sup>

*Fabício Eustáquio Lanza*<sup>5</sup>

*Laércio Zambolim*<sup>6</sup>

*José Edson Fontes Figueiredo*<sup>7</sup>

## Abstract

In recent years, great emphasis has been given to the pathogens that attack maize, mainly for its mycotoxin production capacity. Fumonisin are considered the most important mycotoxins for this culture, being produced in greater amounts by *Fusarium* fungi, which contains highly complex species and their identification. The study of the geographical distribution of *Fusarium* species producing fumonisin and their potential for production of this mycotoxin is crucial for developing management strategies aimed at reducing food contamination levels. Thus, this study aimed to: identify the species of *Fusarium*, of the section *Liseola*, associated with maize grains in Brazil by morphological and molecular methods; determine the predominant species in corn grains in different geographical regions of Brazil; characterize the potential production of fumonisin from isolates of *Fusarium* spp. collected in different regions. Based on the results, we concluded that: *F. verticillioides* is the *Fusarium* species predominantly associated with corn grains in Brazil (99%);

all 50 selected isolates were able to produce fumonisins; high variability in the production of fumonisin, with isolates producing from 0.01 to 2.39  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , was not detected correlation with the geographic region of origin; *F. proliferatum* and *F. subglutinans* are uncommon pathogens in corn in Brazil.

**Keywords:** *Fusarium* spp, fumonisins, mycotoxins, corn.

## Introdução

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de milho, com uma produção acima de 80 milhões de toneladas no ano safra 2013/2014 (CONAB, 2014). Entretanto, nas condições de clima tropical úmido, a ocorrência de doenças tem se tornado um grande limitador da produtividade (OLIVEIRA et al., 2004).

Dentre os patógenos mais importantes na cultura do milho no Brasil, os fungos do gênero *Fusarium* têm trazido grandes preocupações a técnicos e produtores em razão dos danos e prejuízos causados e do risco à saúde humana e animal (OLIVEIRA et al., 2004; MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). As plantas de milho podem ser atacadas por algumas espécies de *Fusarium*, que causam uma variedade de doenças, como podridão de raiz, podridão de colmo, podridão de espiga e de grãos (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Além dos danos econômicos causados por patógenos desse gênero, estes são, também, produtores de micotoxinas, metabólitos secundários altamente tóxicos a humanos e animais (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Dentre as micotoxinas produzidas por *Fusarium*, as fumonisinas são consideradas as mais importantes, pela sua prevalência, níveis de produção e toxicidade (MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997). Estas são



sintetizadas principalmente por *F. verticillioides*, a espécie mais comumente relatada infectando grãos de milho (MADANIA et al., 2013; RAHJOO et al., 2008; ORSI et al., 2000; MUNKVOLD; DESJARDINS, 1997).

As fumonisinas estão envolvidas na inibição da produção de esfingolipídios, com sérias consequências à estrutura celular dos organismos eucarióticos (WANG et al., 1991). Jackson e Jablonski (2004) relatam que a ingestão de grãos de milho infectados por *F. verticillioides* e contaminados com fumonisinas provoca sérias doenças em animais, como a encefalomalácia em equinos e edema pulmonar em suínos. Os mesmos autores relataram que o consumo, por seres humanos, de grãos de milho contaminados por fumonisinas está diretamente relacionado com o câncer esofágico e defeitos na formação do tubo neural em fetos.

A identificação das espécies do gênero *Fusarium* através da análise morfológica é uma tarefa difícil, pois demanda tempo, requer experiência e pode não ser suficiente para a completa distinção das espécies. Isso é especialmente verdade para os membros do complexo de espécies do teleomorfo *Gibberella fujikuroi*, que é composto por mais de 50 espécies, incluindo *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans*, principais organismos encontrados infectando grãos de milho (KVAS et al., 2009; LESLIE et al., 2006). Adicionalmente, análises de sequências de DNA e ensaios com primers específicos para identificação de espécies por meio de PCR podem ser utilizados na determinação dessas espécies (MULÉ et al., 2004; RAHJOO et al., 2008).

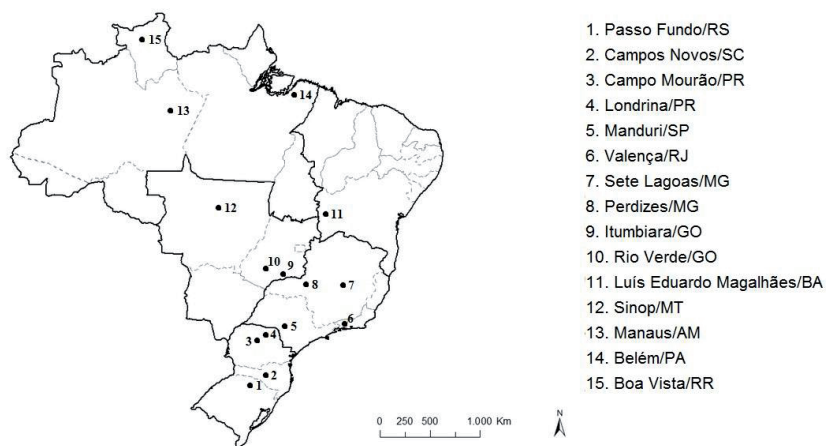
Considerando que o Brasil é um dos maiores produtores de milho do mundo, que as espécies do gênero *Fusarium*, além de causarem grandes prejuízos econômicos, representam um grande risco à saúde humana e animal por causa da capacidade de produzir micotoxinas e, ainda, que existe uma grande variação quanto à capacidade de produção de micotoxinas entre e dentro das espécies de *Fusarium*, é fundamental, para o estabelecimento das estratégias de manejo, o conhecimento das espécies de *Fusarium* predominantes nas principais regiões produtoras de milho. Além disso, essas informações são fundamentais para o estabelecimento de estratégias de manejo visando a redução dos prejuízos causados pela contaminação dos grãos por esses grupos de fungos e dos riscos por causa da produção de micotoxinas. Desse modo, o presente trabalho teve como objetivos: Identificar as espécies de *Fusarium* da seção *Liseola* associadas a grãos de milho no Brasil por métodos morfológicos e moleculares; Determinar as espécies predominantes em grãos de milho nas diferentes regiões geográficas do Brasil; Caracterizar o potencial de produção de fumonisinas de isolados de *Fusarium* spp. coletados em diferentes regiões brasileiras.

## **Material e Métodos**

### **Obtenção dos Isolados**

As coletas das amostras de grãos de milho foram realizadas nas principais regiões produtoras, envolvendo áreas com grandes diversidades quanto às condições climáticas (Figura 1). Cada amostra foi constituída por espigas de milho apresentando ou não sintomas de infecção por fungos do gênero *Fusarium*. As espigas foram encaminhadas ao Laboratório de Fitopatologia

da Embrapa Milho e Sorgo, onde foram debulhadas, e a massa de grãos foi homogeneizada. Posteriormente, foram retiradas subamostras para compor o teste de *Blotter*. Para realização do teste, os grãos foram inicialmente desinfestados por meio da imersão em hipoclorito de sódio a 2% por cinco minutos. Em seguida, foram lavados duas vezes em água destilada esterilizada. Após esse procedimento, foram colocados 25 grãos em cada caixa tipo gerbox contendo papel de filtro umedecido com Ágar-Água a 5%. Foram utilizadas oito caixas gerbox, totalizando 200 grãos por amostra (PINTO et al., 2007). As caixas gerbox foram mantidas em temperatura ambiente sob luz contínua para estimular a germinação dos grãos.



**Figura 1.** Localidades onde foram realizadas as coletas das amostras de grãos de milho para isolamento das espécies de *Fusarium*

Após 24 horas, as caixas gerbox contendo os grãos, foram transferidas para o freezer a -5 °C, por um período de 24 horas, paralisando o processo de germinação. As caixas foram levadas à câmara de incubação a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após 10 dias, procedeu-se à identificação e quantificação

dos patógenos presentes nos grãos, com o auxílio de um microscópio estereoscópio e de um microscópio binocular.

Os grãos apresentando colônias características de *Fusarium* (micélio cotonoso de coloração branca a rósea) foram coletados e transferidos para placas de Petri contendo meio BDA, a partir das quais foram obtidas as culturas monospóricas. Cada cultura monospórica, aqui denominada isolado, foi devidamente identificada considerando-se a data, a cultivar de milho e o local de coleta. Foram obtidos um total de 230 isolados monospóricos de *Fusarium*. Estes isolados foram armazenados e conservados em tubos de ensaio contendo BDA e óleo mineral.

A identificação das espécies de *Fusarium* presentes nos grãos foi composta de duas etapas: identificação morfológica e confirmação molecular das espécies identificadas.

## **Identificação Morfológica**

Para a identificação morfológica, todos os isolados foram cultivados em meio BDA e incubados a 25 °C, sob fotoperíodo de 12 horas durante 14 dias. As características macroscópicas da colônia foram analisadas com o auxílio de um microscópio estereoscópio e um microscópio binocular. A morfologia dos microconídios, macroconídios, células conidiogênicas (fiálides) e clamidósporos foi observada para cada isolado e as espécies foram identificadas de acordo com os critérios propostos por Leslie et al. (2006).

## Identificação Molecular

Para a identificação molecular, os isolados foram cultivados em meio BD (batata dextrose) líquido durante três dias em agitador orbital a 90 rpm sob luz contínua. Após esse período, o micélio foi coletado com auxílio de uma gaze esterilizada e, posteriormente, congelado em nitrogênio líquido. O DNA total foi extraído de cada um dos isolados utilizando protocolo adaptado descrito por Murray e Thompson (1980). Os pares de primers *VER1/2*, *PRO1/2* e *SUB1/2* (Tabela 1) foram utilizados em ensaios de PCR espécie-específicos com intuito de identificar *F. verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* respectivamente.

**Tabela 1.** Sequências dos primers utilizados para a identificação das espécies de *Fusarium* isoladas dos grãos de milho.

Nome dos primers	Sequencias dos primers (5' → 3')	Especificidade de espécie
<i>SUB1</i>	CTGTCGCTAACCTCTTTATCCA	<i>F. subglutinans</i> <sup>a</sup>
<i>SUB2</i>	CAGTATGGACGTTGGTATTATCTAA	
<i>PRO1</i>	CTTTCCGCCAAGTTTCTTC	<i>F. proliferatum</i> <sup>a</sup>
<i>PRO2</i>	TGTCAGTAACTCGACGTTGTTG	
<i>VER1</i>	CTTCCTGCGATGTTTCTCC	<i>F. verticillioides</i> <sup>a</sup>
<i>VER2</i>	AATTGGCCATTGGTATTATATATCTA	
<i>EF1</i>	ATGGGTAAGGA(A/G)GACAAGAC	Todas as espécies de <i>Fusarium</i> <sup>b</sup>
<i>EF2</i>	GGA(G/A)GTACCAAGT(G/C)ATCATGTT	

<sup>a</sup>Mulé et al. (2004), <sup>b</sup>O'Donnell et al. (1998), Geiser et al. (2004)

As reações de PCR foram realizadas separadamente para cada conjunto de primers num volume final de 20 µl contendo Tris-HCl 200 mM (pH 8,4); KCl 500 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; primers 0,5 µM; dNPTs 0,25 mM; 1 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen) e 20 ng de DNA. As condições de amplificação foram: 95 °C por 5 minutos (desnaturação), 94 °C por 50 segundos + 56 °C por 50 segundos + 72 °C por 1 minuto (anelamento) e 72 °C por 7 minutos (extensão).

Isolados padrões obtidos da Coleção Micológica da Universidade Federal de Lavras, identificados como CML770

(*F. subglutinans*), CML2394 (*F. proliferatum*) e CML2395 (*F. verticillioides*), foram utilizados como controles para validação dos resultados.

## **Produção de Fumonisinhas por Isolados de *Fusarium verticillioides***

Para a caracterização quanto ao potencial de produção de fumonisinhas foram selecionados aleatoriamente 50 isolados de *F. verticillioides* obtidos em diferentes regiões amostradas.

Todos os 50 isolados foram cultivados em placas de Petri contendo meio BDA (batata dextrose ágar) e mantidos em câmara de incubação a 27 °C, durante 7 dias sob fotoperíodo de 12 horas. De cada placa foi obtido o inóculo, sob a forma de quatro discos de micélio, apresentando 0,5 cm de diâmetro. Os discos foram colocados de forma equidistante em placas de Petri contendo 40 g de grãos de milho triturados (“canjiquinha”), previamente esterilizado e umedecido com 20 mL de água deionizada. As culturas foram incubadas a 27 °C por 14 dias sob fotoperíodo de 12 horas, seguindo metodologia proposta por Ono et al. (2010).

Para a determinação do teor de fumonisinhas totais, as amostras foram colocadas em estufa de ventilação forçada a 65 °C durante 48 horas, para homogeneizar o teor de água. O teor de fumonisinhas totais foi determinado em 10 g de amostra, em duplicada, utilizando-se um fluorímetro marca VICAN, de acordo com os procedimentos descritos nos manuais VICAN, utilizando-se colunas de imunoafinidade FumoniTest®.

Aos dados dos teores de fumonisinas foi aplicada análise de variâncias e as médias, quando necessário, foram comparadas entre si, pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade utilizando o programa SISVAR® (FERREIRA, 2011).

## Resultados

### Identificação Morfológica

Por meio das observações morfológicas dos 230 isolados coletados, 207 foram identificados ao nível de espécie, com base nos critérios morfológicos propostos por Leslie et al. (2006). Destes, 200 foram identificados como *F. verticillioides*. Alguns isolados desta espécie apresentaram monofiálides agrupadas e grande quantidade de macroconídios, dificultando a sua identificação. Nestes casos, a presença do septo na base de cada fiálide, o qual permitiu identificá-las como monofiálides, foi o critério utilizado para identificar os isolados como *F. verticillioides*.

Sete isolados foram identificados como *F. proliferatum*. A presença de polifiálides, de cadeias curtas de microconídios ou presença de falsas cabeças foram as características consideradas para a identificação dessa espécie (LESLIE et al., 2006). Nos demais casos (23 isolados), as características citadas anteriormente não foram observadas, não sendo possível sua identificação ao nível de espécie.

### Identificação Molecular

Todos os isolados foram avaliados com os primers espécie-específico *VER1/2*, *PRO1/2* e *SUB1/2*. Dos 230 isolados

analisados, 228 apresentaram amplificação quando se utilizou o primer *VER1/2*, sendo, portanto, identificados como *F. verticillioides*. Somente dois isolados apresentaram amplificação quando se utilizou o primer *PRO1/2*, ao quais foram identificados como *F. proliferatum*. Esses isolados foram coletados em Manduri/SP e Manaus/AM. Em todas as outras localidades foi detectada somente uma espécie. Não houve amplificação quando se utilizou o primer *SUB1/2*.

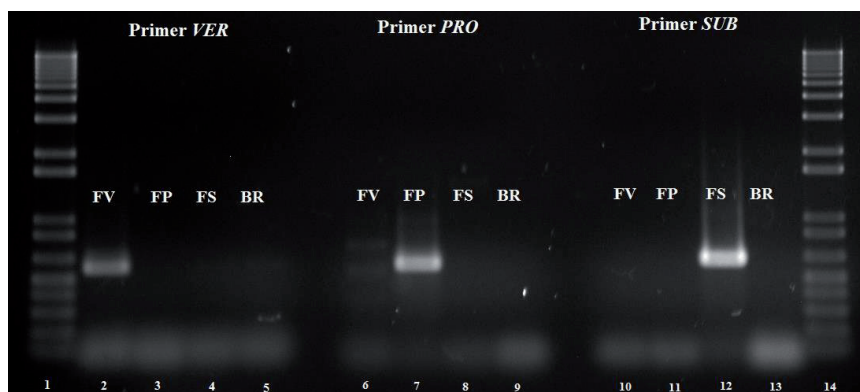
O ensaio para validação da especificidade dos primers está apresentado na Figura 2. Os primers utilizados no presente estudo somente geraram produtos de amplificação na espécie-alvo.

### **Produção de Fumonisinhas por Isolados de *F. verticillioides***

Foi constatada alta variabilidade na capacidade de produção de fumonisinhas nos 50 isolados selecionados, com teores variando de 0,01 a 2,39  $\mu\text{g.g}^{-1}$ . Os isolados foram agrupados em cinco categorias quanto à capacidade de produção de fumonisinhas: Grupo 1 (24%) - Baixa produção ( $<0,38 \mu\text{g.g}^{-1}$ ); Grupo 2 (40%) – Moderadamente baixa produção ( $>0,38$  a  $0,85 \mu\text{g.g}^{-1}$ ); Grupo 3 (26%) – Média produção ( $>0,85$  a  $1,39 \mu\text{g.g}^{-1}$ ); Grupo 4 (6%) – Moderadamente alta produção ( $>1,39$  a  $1,69 \mu\text{g.g}^{-1}$ ); Grupo 5 (4%) – Alta produção ( $>1,69 \mu\text{g.g}^{-1}$ ) (Tabela 2).

Os isolados *F159* e *F310* apresentaram a maior capacidade de produção de fumonisinhas dentre os isolados avaliados, produzindo 2,32 e 2,39  $\mu\text{g.g}^{-1}$ , respectivamente. Outros 12 isolados apresentaram baixa capacidade de produção de fumonisinhas (de 0,01 a 0,38  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), sendo considerados traços de produção da micotoxina nas condições do teste.





**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose do produto da PCR utilizando os três pares de primers espécies-específicos e as três espécies padrões. Canaletas 1 e 14: marcador 1 Kb Plus (Invitrogen). Canaletas 2 a 5: produto da PCR utilizando os primers *VER*1/2: *F. verticillioides* (FV - canaleta 2), *F. proliferatum* (FP - canaleta 3), *F. subglutinans* (FS - canaleta 4) e o produto da PCR sem adição de DNA (BR - branco, canaleta 5). Canaletas 6 a 9: produto da PCR utilizando os primers *PRO*1/2: *F. verticillioides* (FV - canaleta 6), *F. proliferatum* (FP - canaleta 7), *F. subglutinans* (FS - canaleta 8) e o produto da PCR sem adição de DNA (BR - branco, canaleta 9). Canaletas 10 a 13: produto da PCR utilizando o primer *SUB*1/2: *F. verticillioides* (FV - canaleta 10), *F. proliferatum* (FP - canaleta 11), *F. subglutinans* (FS - canaleta 12) e o produto da PCR sem adição de DNA (BR - branco, canaleta 13).

Verificou-se também que os isolados coletados numa mesma região geográfica apresentaram alta variabilidade quanto à produção de fumonisinas. Como exemplo, isolados coletados na região de Luiz Eduardo Magalhães/BA apresentaram valores de produção de fumonisinas variando de 0,60 (*F313*) a 2,39  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (*F310*). Situação similar foi observada para os isolados coletados em Passo Fundo/RS, cujos valores variaram de 0,22 (*F150*) a 2,32  $\mu\text{g.g}^{-1}$  (*F159*). Na região de Manaus/AM,

os isolados *F400* e *F415*, produziram 0,08 e 1,25  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  de fumonisinias, respectivamente.

**Tabela 2.** Amplificação por PCR utilizando o primer *VER1/2* e produção de fumonisinias de 50 isolados coletados em diferentes regiões brasileiras.

Localidade	Isolado	Deteção primers <i>VER1/2</i>	*Fumonisinias ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )	
Sete Lagoas/MG	<i>F73</i>	+	0,85	b
Sete Lagoas/MG	<i>F75</i>	+	0,54	b
Campo Mourão/PR	<i>F105</i>	+	0,01	a
Campo Mourão/PR	<i>F110</i>	+	0,14	a
Rio Verde/GO	<i>F115</i>	+	0,02	a
Rio Verde/GO	<i>F118</i>	+	1,15	c
Perdizes/MG	<i>F125</i>	+	1,08	c
Perdizes/MG	<i>F129</i>	+	0,81	b
Londrina/PR	<i>F135</i>	+	0,79	b
Londrina/PR	<i>F140</i>	+	0,46	b
Passo Fundo/RS	<i>F150</i>	+	0,22	a
Passo Fundo/RS	<i>F154</i>	+	1,12	c
Passo Fundo/RS	<i>F155</i>	+	0,69	b
Passo Fundo/RS	<i>F159</i>	+	2,32	e
Rio Verde/GO	<i>F176</i>	+	1,35	c
Rio Verde/GO	<i>F177</i>	+	0,68	b
Luis Eduardo Magalhães/BA	<i>F308</i>	+	0,62	b
Luis Eduardo Magalhães/BA	<i>F310</i>	+	2,39	e
Luis Eduardo Magalhães/BA	<i>F311</i>	+	1,69	d
Luis Eduardo Magalhães/BA	<i>F312</i>	+	1,02	c
Luis Eduardo Magalhães/BA	<i>F313</i>	+	0,60	b
Luis Eduardo Magalhães/BA	<i>F315</i>	+	1,02	c
Campos Novos/SC	<i>F320</i>	+	0,38	a
Campos Novos/SC	<i>F321</i>	+	0,82	b
Campos Novos/SC	<i>F323</i>	+	0,73	b
Campos Novos/SC	<i>F325</i>	+	0,59	b
Roraima/RR	<i>F375</i>	+	0,71	b
Roraima/RR	<i>F378</i>	+	0,03	a
Roraima/RR	<i>F380</i>	+	0,71	b
Roraima/RR	<i>F383</i>	+	0,36	a
Manduri/SP	<i>F391</i>	+	0,16	a
Manduri/SP	<i>F393</i>	+	0,51	b
Manduri/SP	<i>F395</i>	+	0,38	a
Manduri/SP	<i>F397</i>	+	1,02	c
Manaus/AM	<i>F400</i>	+	0,08	a
Manaus/AM	<i>F403</i>	+	0,99	c
Manaus/AM	<i>F406</i>	+	0,20	a
Manaus/AM	<i>F415</i>	+	1,25	c
Sinop/MT	<i>F420</i>	+	1,69	d
Sinop/MT	<i>F422</i>	+	1,05	c
Sinop/MT	<i>F423</i>	+	0,99	c
Sinop/MT	<i>F425</i>	+	1,65	d
Valença/RJ	<i>F431</i>	+	0,45	b
Valença/RJ	<i>F432</i>	+	0,38	a
Valença/RJ	<i>F433</i>	+	1,34	c
Valença/RJ	<i>F436</i>	+	0,62	b
Belém/PA	<i>F440</i>	+	0,48	b
Belém/PA	<i>F442</i>	+	0,72	b
Belém/PA	<i>F444</i>	+	1,39	c
Belém/PA	<i>F446</i>	+	0,46	b

\*médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Scott Knott a 5% de probabilidade.

## Discussão

Utilizando os critérios morfológicos descritos por Leslie et al. (2006), foi possível identificar, ao nível de espécie, 207 dos 230 isolados utilizados neste estudo. Dos 207 isolados identificados, sete pertenceram a espécie *F. proliferatum*. Por meio da análise molecular utilizando primers espécie-específico, somente dois dos sete isolados foram confirmados como *F. proliferatum*. Os demais isolados foram identificados como *F. verticillioides*. Os 23 isolados identificados como *Fusarium* spp, utilizando-se os critérios morfológicos, foram identificados como *F. verticillioides* quando foram utilizadas as análises moleculares com primer espécie-específico. Os outros 200 isolados identificados morfolologicamente como *F. verticillioides* tiveram sua identificação confirmada pelos testes moleculares. Vários estudos descrevem a dificuldade ou a impossibilidade de distinção de espécies de *Fusarium* associadas a grãos de milho por meio de observações morfológicas (MADANIA et al., 2013; RAHJOO et al. 2008; SUMMERELL et al., 2003; LESLIE et al., 2006). Os resultados obtidos no presente trabalho reforçam a dificuldade de se identificar, ao nível de espécie, alguns isolados desse gênero.

A utilização de análises moleculares através de reação de PCR com primers específicos permitiu realizar a identificação segura das espécies de *Fusarium*, mesmo nos casos em que não foi possível sua identificação por meio dos critérios morfológicos. Rahjoo et al. (2008) relatam que, dos 140 isolados identificados morfolologicamente como *F. verticillioides* em seu estudo, 133 foram confirmados como *F. verticillioides* quando utilizadas técnicas moleculares com primer específicos. Dos 7 isolados restantes, um foi identificado como *F. thapsinum*, quatro como

*F. proliferatum* e dois como *Fusarium* spp. Esses resultados corroboram com os resultados encontrados no presente trabalho, e demonstram a complexidade da identificação morfológica das espécies de *Fusarium* associadas a grãos de milho.

A alta frequência de *F. verticillioides* (99,13%) detectada entre os isolados obtidos no presente estudo tem sido relatada, também, em outros trabalhos (MUNKVOLD, 2003; RAHJOO et al., 2008; VENTURINI et al., 2011; MADANIA et al., 2013). Rocha et al. (2011), analisando a frequência de espécies de *Fusarium* em grãos de milho em quatro diferentes regiões brasileiras, também relatam a predominância de *F. verticillioides* (96%) em um total de 100 isolados.

Em adição a *F. verticillioides*, outras espécies têm sido relatadas causando podridões de espiga em milho. *F. proliferatum* foi relatado juntamente com *F. verticillioides* na Itália (LOGRIECO et al., 1995), no sul da Europa (LOGRIECO et al., 2002) e no Irã (RAHJOO et al., 2008). Por outro lado, *F. proliferatum* e *F. subglutinans* foram encontrados em baixa frequência na Áustria (KRSKA et al., 1997), República da Eslováquia (PIECKOVÀ; JESENSKÁ, 1997), na Polônia (KOSTECHI et al., 1995) e no México (DESJARDINS et al., 2000). Em estudo realizado por Rocha et al. (2011), foram detectados somente dois isolados de *F. proliferatum* obtidos de amostra proveniente de Oliveira dos Campinhos no estado da Bahia. No presente estudo, dos 230 isolados, foram detectados somente dois isolados de *F. proliferatum*, um proveniente de amostras obtidas no estado do Amazonas e outro do estado de São Paulo. Apesar de os isolados de *F. proliferatum* terem sido encontrados em diferentes localidades quando comparadas ao trabalho de

Rocha et al. (2011), deve-se considerar que essas diferenças podem ter ocorrido em razão do processo de amostragem. A baixa frequência de *F. proliferatum* e a ausência de *F. subglutinans* verificadas no presente trabalho, indicam que essas duas espécies são pouco relevantes como patógenos em milho no Brasil, assim como relatado em trabalhos realizados em outros países (COVARELLI et al., 2012; MADANIA et al., 2013).

A alta variabilidade quanto à produção de fumonisinas verificada entre os isolados utilizados neste trabalho está de acordo com relatos da literatura em outros países (COVARELLI et al., 2012; ROCHA et al., 2011; ONO et al. 2010; PICOT et al., 2010; NELSON et al., 1991). No presente estudo, não foi verificada correlação entre a produção de fumonisinas e a localização geográfica dos isolados. Isolados com maior capacidade de produção de fumonisinas apresentaram uma distribuição uniforme em todas as regiões amostradas.

Muitos genes estão envolvidos na regulação da produção de fumonisinas em *F. verticillioides*. Além do fator genético, outros fatores podem interferir na biossíntese dessa micotoxina, como: temperatura, atividade de água nos grãos, nutrição da planta e fatores ligados à resistência genética no hospedeiro. Portanto, a regulação da produção de fumonisinas é um processo complexo governado por condições ambientais e por interações com a planta hospedeira (PICOT et al., 2010). Os níveis máximos de fumonisinas detectados no presente trabalho foram relativamente baixos quando comparados aos níveis comumente detectados em amostras provenientes de campo e relatados em outros trabalhos de pesquisa (NELSON et al., 1991; ROCHA et al., 2011). Neste caso, após a repicagem

dos isolados, eles permaneceram colonizando o substrato, composto por grãos de milho, durante um período de 14 dias, conforme metodologia proposta por Ono et al. (2010). Nos trabalhos realizados por Nelson et al. (1991) e Rocha et al. (2011) foram detectados níveis de fumonisinas mais elevados do que os verificados neste trabalho, entretanto, o período de colonização do substrato pelos isolados foi de, aproximadamente, 30 dias. Vale ressaltar que o objetivo deste trabalho não foi expressar os níveis máximos de produção de fumonisinas pelos isolados de *F. verticillioides*, mas, sim, avaliar a variabilidade na capacidade de produção de fumonisinas existente entre os isolados obtidos em diferentes regiões produtoras de milho no Brasil.

## Conclusões

Com base nos resultados obtidos, foi possível concluir que: *F. verticillioides* é a espécie do gênero *Fusarium* predominantemente associada a grãos de milho no Brasil; todos os 50 isolados selecionados foram capazes de produzir fumonisinas; verificou-se elevada variabilidade na produção de fumonisinas e não foi detectada correlação com a região geográfica de origem; *F. proliferatum* e *F. subglutinans* são patógenos pouco frequentes em milho no Brasil.

## Referências

CONAB. Companhia Nacional de Abastecimento. **Estimativa de produção de grãos no Brasil**: levantamento abril de 2013. Brasília, 2014. Disponível em: <<http://www.conab.gov.br>>. Acesso em: 9 maio 2013.

COVARELLI, L.; STIFANO, S.; BECCARI, G.; RAGGI, L.; LATTANZIO, V. M. T.; ALBERTINI, E. Characterization of *Fusarium verticillioides* strains isolated from maize in Italy: fumonisin production, pathogenicity and genetic variability. **Food Microbiology**, London, v. 31, n. 1, p. 17-24, 2012.

DESJARDINS, A. E.; PLATTNER, R. D.; GORDON, T. R. *Gibberella fujikuroi* mating population A and *Fusarium subglutinans* from teosinte species and maize from Mexico and Central America. **Mycological Research**, Cambridge, v. 104, p. 865-872, 2000.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

GEISER, D. M.; JIMENZ GASCO, M. M.; KANG, S.; MKALOWSKA, L.; VEERARAGHAVAN, N.; WARD, T. J.; ZHANG, N.; KULDAU, G. A.; O'DONNELL, K. FUSARIUM-IDv.1.0: a DNA sequence database for identifying *Fusarium*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 473-479, 2004.

JACKSON, L.; JABLONSKI, J. Fumonisin. In: MAGAN, N.; OLSEN, M. (Ed.). **Mycotoxins in food: detection and control**. Boca Raton: CRC, 2004. p. 384-422.

KOSTECHI, M.; SZCZESNA, J.; CHELKOWSKI, J.; WISNIEWSKA, H. Beauvericin and moniliformin production by Polish isolates of *Fusarium subglutinans* and natural co-occurrence of both mycotoxins in cereal grain samples. **Microbiologie Aliments Nutrition**, v. 13, p. 67-70, 1995.

KRSKA, R.; SCHUHMACHER, R.; GRASSERBAUER, M.;  
LEMMENS, M.; LEMMENS-GRUBER, R.; ADLER, A.; LEW, H.  
Effects of beauvericin to mammalian tissue and its production  
by Austrian isolates of *Fusarium proliferatum* and *Fusarium  
subglutinans*. **Mycotoxin Research**, Mainz, v. 13, p. 11-16, 1997.

KVAS, M.; MARASAS, W. F. O.; WINGFIELD, B. D.; WINGFIELD,  
M. J.; STEENKAMP, E. T. Diversity and evolution of *Fusarium*  
species in the *Gibberella fujikuroi* complex. **Fungal Divers**, v. 34,  
p. 1-21, 2009.

LESLIE, J. F.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S. **The *Fusarium*  
laboratory manual**. Oxford: Wiley-Blackwell, 2006. 388 p.

LOGRIECO, A.; MORETTI, A.; RITIENE, A.; BOTTALICO,  
A.; CORDA, A. Occurrence and toxigenicity of *Fusarium  
proliferatum* from preharvest maize ear rot, and associated  
mycotoxins, in Italy. **Plant Disease**, St. Paul, v. 79, p. 727-731,  
1995.

LOGRIECO, A.; MULÈ, G.; MORETTI, A.; BOTTALICO, A. Toxigenic  
*Fusarium* species and mycotoxins associated with maize ear rot  
in Europe. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v.  
108, p. 597-609, 2002.

MADANIA, A.; ALTAWIL, M.; NAFFAA, W.; VOLKER, P. H.; HAWAT,  
M. Morphological and molecular characterization of *Fusarium*  
isolated from maize in Syria. **Journal of Phytopathology**, Berlin,  
v. 161, n. 7/8, p. 452-458, 2013.



MULÉ, G.; SUSCA, A.; STEA, G.; MORETTI, A. A species-specific PCR assay based on the calmodulin partial gene for identification of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. subglutinans*. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 110, p. 495-502, 2004.

MUNKVOLD, G. P. Epidemiology of *Fusarium* disease and their mycotoxins in maize ears. **European Journal of Plant Pathology**, Dordrecht, v. 109, p. 705-713, 2003.

MUNKVOLD, G. P.; DESJARDINS, A. E. Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? **Plant Disease**, St. Paul, v. 81, n. 6, p. 556-565, 1997.

MURRAY, H. G.; THOMPSON, W. F. Rapid isolation of molecular weight DNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 8, p. 4321-4325, 1980.

NELSON, P. E.; PLATTNER, R. D.; SHACKELFORD, D. D.; DESJARDINS, A. E. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* strains from various substrates and geographic areas. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 57, p. 2410-2412, 1991.

O'DONNELL, K.; KISTLER, H. C.; CIGELINK, E.; PLOETZ, R. C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 95, p. 2044-2049, 1998.

OLIVEIRA, E. de; FERNANDES, F.T.; CASELA, C. R.; PINTO, N. F. J. A.; FERREIRA, A. S. Diagnose e controle de doenças na cultura do milho. In: GALVÃO, J. C. C.; MIRANDA, G. V. (Ed.). **Tecnologias de produção do milho**. Viçosa-MG: Universidade Federal de Viçosa, 2004. p. 226-267.

ONO, E. Y. S.; FUNGARO, M. H. P.; SOFIA, S. H.; MIGUEL, T. A.; SUGIURA, Y.; HIROOKA, Y. *Fusarium verticillioides* strains isolated from corn feed: characterization by fumisin production and RAPD fingerprinting. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, p. 953-960, 2010.

ORSI, R. B.; CORRÊA, B.; POSSI, C. R.; SCHAMMASS, E. A.; NOGUEIRA, J. R.; DIAS, S. M. C.; MALOZZI, M. A. B. Mycoflora and occurrence of fumonisins in freshly harvested and stored hybrid maize. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 36, p. 75-87, 2000.

PICOT, A.; BARREAU, C.; PINSON-GADAIS, L.; CARON, D.; LANNOU, C.; RICHARD-FORGET, F. Factors of the *Fusarium verticillioides* - maize environment modulating fumisin production. **Critical Reviews in Microbiology**, Boca Raton, v. 36, n. 3, p. 221-231, 2010.

PIECKOVÀ, E.; JESENSKÀ, Z. *Fusarium-moniliforme* and F-subglutinans in maize-based foodstuffs in the slovak republic. **Cereal Research Communications**, Szeged, v. 25, p. 609- 610, 1997.

PINTO, N. F. J. A.; VARGAS, E. A.; PREIS, R. A. Qualidade sanitária e produção de fumonisina B1 em grãos de milho na fase de pré-colheita. **Summa Phytopathologica**, Piracicaba, v. 33, n. 3, p. 304-306, 2007.

RAHJOO, V.; ZAD, J.; JAVAN-NIKKHAH, M.; MIRZADI GOHARI, A.; OKHOVAT, S. M.; BIHANTA, M. R.; RAZZAGHIAN, J.; KLEMSDAL, S. S. Morphological and molecular identification of *Fusarium* isolated from maize ears in Iran. **Journal of Plant Pathology**, v. 90, n. 3, p. 463-468, 2008.

ROCHA, L. O.; REIS, G. M.; SILVA, V. N.; BRAGHINI, R.; TEIXEIRA, M. M. G.; CORREA, B. Molecular characterization and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* isolated from corn grains of different geographic origins in Brazil. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 145, p. 9-21, 2011.

SUMMERELL, B. A.; SALLEH, B.; LESLIE, J. F. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. **Plant Disease**, St. Paul, v. 87, p. 117-128, 2003.

VENTURINI, G.; ASSANTE, G.; VERCESI, A. *Fusarium verticillioides* contamination patterns in Northern Italian maize during the growing season. **Phytopathology Mediterranean**, v. 50, p. 110-120, 2011.

WANG, E.; NORRED, W. P.; BACON, C. W.; RILEY, R. T.; MERRIL, A. H. 1991. Inhibition of sphingolipid biosynthesis by fumonisins. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 266, p. 14486-14490, 1991.

## Literatura Recomendada

AGRIANUAL. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2013. 480 p.

GERLACH, W.; NIRENBERG, H. **The genus *Fusarium***: a pictorial atlas. Berlin: Parey, 1982. (Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt für Land-und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, H 209).

GHASIAN, S. A.; KORD-BACHEH, P.; REZAYAT, S. M.; MAGHSOOD, A. H.; TAHERKHANI, H. Mycoflora of Iranian maize harvested in main population area in Iran. **Mycopathologia**, The Hague, v. 158, p. 113-121, 2004.

LESLIE, J. F. Mating populations in *Gibberella fujikuroi* (*Fusarium* section *Liseola*). **Phytopathology**, St. Paul, v. 81, p. 1058-1060, 1991.

LESLIE, J. F.; PEARSON, C. A.; NELSON, P. A.; TOUSSOUN, T. A. *Fusarium* spp. from corn, sorghum, and soybean fields in the central and eastern United States. **Phytopathology**, St. Paul, v. 86, p. 343-350, 1990.

SYDENHAM, E. W.; MARASAS, W. F. O.; SHEPHARD, G. S.; THIEL, P. G.; HIROOKA, E. Y. Fumonisin concentrations in Brazilian feeds associated with field outbreaks of confirmed and suspected animal mycotoxicoses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 40, p. 994-997, 1992.

UENO, Y. Risk of multi-exposure to natural toxins. **Mycotoxins**, v. 50, p. 13-22, 2000.

